岡田　博*：キツネノボタンの核型変異による性的隔離について**

Hiroshi OKADA*: On sexual isolation caused by karyotype variations in *Ranunculus silerifolius* Lév.

核型の違いが近縁の植物群で種の違いとどの様に関連しているのかは多くの核学的研究で明らかにされてきた。それらによると大きく3つの様式があるように思われる。1つは核型の違いと種の違いとの間に並行関係の見られる場合，2つは種は違っていても核型がほぼ共通している場合，そして3は核型が違っていてもそれが種の違いとなって現われてこない場合である。最後の場合の例としてエンレイソウ，ツルボ等における一連の研究結果がよく知られている。

これらの研究の大部分は自然集団の直接的観察を主に行ない，交配実験による F_1 の稔性の変化による類縁関係の推定を行なった研究はあまりない。Araki (1971) はツルボの A(x=8)，B(x=9) ゲノムをそれぞれホモに持つ二倍性の個体間で交配を行ない，その F_1 が約1％の稔性しかないことを見出し，またA，B両ゲノムの関係を推定した。

筆者はキツネノボタンにおける染色体多型現象が種分化にどの様な意味を持っているのか，様々な方法で検討している。それらのうち，交配実験の結果からこの現象が種分化の重要な一段階である生殖的隔離現象を引き起こしていることを見出した。同時にその結果から各型間の類縁関係も推定できたので合わせて報告する。

材料と方法　実験に用いた材料の産地を Table 1 に示した。

Table 1. Karyological types and sources of the individuals investigated

Type	Sources
Matsuyama type	Matsuyama City, Ehime Pref., Shikoku Dist.
	Mt. Ryozen, Shiga Pref., Kinki Dist.
	Shirahama, Wakayama Pref., Kinki Dist.
Otaru type	Atsugi City, Kanagawa Pref., Kanto Dist.
	Shimofuro, Aomori Pref., Tohoku Dist.
	Usa, Yamaguchi Pref., Chugoku Dist.
	Mt. Mitsuishi, Chiba Pref., Kanto Dist.
	Oyashirazu, Niigata Pref., Chubu Dist.
Karatsu type	Isl. Yaku, Kagoshima Pref., Kyushu Dist.
	Sandankyo, Hiroshima Pref., Chugoku Dist.

---

* 大阪大学教養部生物学教室. Department of Biology, College of General Education, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560.

** 本研究は文部省科学研究費，奨励研究（A）No. 474319 の補助を受けた.

1．交配方法　キツネノボタン *Ranunculus silerifolius* Lév. (=*R. quelpaertensis* (Lév.) Nakai) は自家稔性であるので交配は注意深く行なった。雌親の花は除雄後，柱頭に花粉が付着していないことを確かめた。雄親から裂開した葯を取り出して雌親の柱頭に直接こすりつけて受粉させ，直ちに袋をかけて昆虫等による受粉を防いだ。4～5週間で種子は熟する。

2．染色体の観察　体細胞分裂中期染色体の観察は Okada & Tamura (1977) と同様に行なった。

減数分裂の観察は以下の様に行なった。5°C の45%酢酸で15分以上固定した葯から花粉母細胞 (PMC) を取り出し，これを1%酢酸オルセイン液で約20分染色し，カバーグラスをかけて，軽く押しつぶした。

3．花粉稔性の算定　花粉は開花した花の葯より取り出した。アルコール中で花粉を取り出して風乾後，コットンブルー・ラクトフェノール溶液で染色した。内容物が濃く染まり充実している花粉で，形の正常なものを稔性があるとした。各個体から1つの

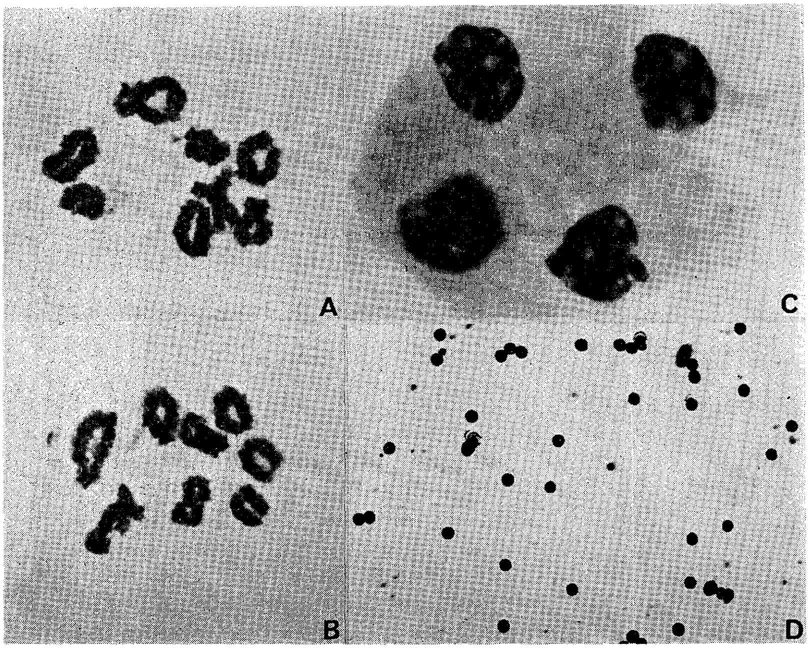

Fig. 1. Photomicrographs of meiosis and pollen grains of individuals of Matsuyama type. A. Shirahama, showing 8 bivalents. B. Matsuyama×Mt. Ryozen, showing 8 bivalents. C. Normal tetrad observed in both natural populations and artificial hybrids between different sources of the same type. D. Pollen grains stained by cotton blue・lacto phenol solution. A, B, C ×1500, D ×50

花を取り，それぞれ500〜1000粒の花粉を観察して稔性率を算定した。

結　果

1.　核型分析　Fujishima & Kurita (1974), Okada & Tamura (1977) が区別した松山型，小樽型，および唐津型の各型内，各型間で交配して得られた6種類の種子は発芽後，交配が成功していたかどうかを検定するため，体細胞分裂中期染色体の形態で確かめられた。各型に特徴的な第1，第6（付随体染色体），第8染色体を指標として検定した結果，いずれの場合も交配は成功していた（Okada & Tamura 1977参照，Figs. 4A, 5A, 6A）。

2.　減数分裂，および花粉の稔性　a．親株，および同型・異産地間の F_1　交配に用いた各親株，および松山型間（松山産×霊仙山産），小樽型間（厚木産×下風呂産），唐津型間（屋久島産×三段峡産）の交配株の PMC はいずれも正常な二価染色体を8つ形成し，また正常な四分子を形成していた（Figs. 1, 2, 3）。花粉の稔性は Figs. 1D, 2D, 3D, Table 2 で示された様にいずれも90%以上あり，親株と同型異産地間の F_1 との間に差は認められない。この結果は同じ核型を示す株間では地理的に隔たっていても生殖的隔離はないことを示している。

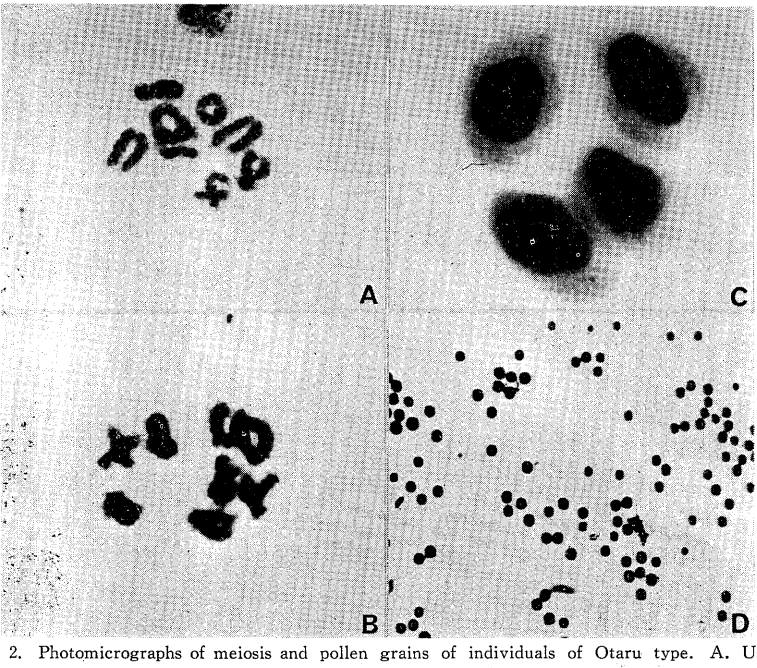

Fig. 2. Photomicrographs of meiosis and pollen grains of individuals of Otaru type. A. Usa, showing 8 bivalents. B. Atsugi×Shimofuro, showing 8 bivalents. C. Normal tetrad. D. Pollen grains. A, B, C ×1500. D ×50.

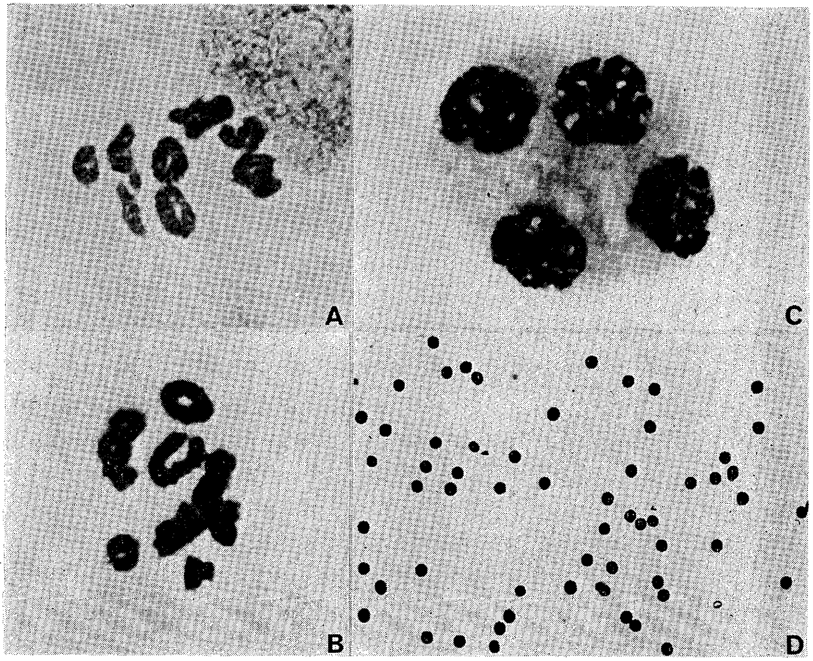

Fig. 3. Photomicrographs of meiosis and pollen grains of individuals of Karatsu type. A. Isl. Yaku, showing 8 bivalents. B. Isl. Yaku×Sandankyo, showing 8 bivalents. C. Normal tetrad. D. Pollen grains. A, B, C ×1500. D ×50.

b．異型間の F_1　i. 松山型×小樽型（白浜産×宇佐産，松山産×厚木産）

いずれの F_1 でもほぼ同じ結果を示した。観察した全ての PMC で棒状の四価染色体1つと二価染色体6つとが観察された（Fig. 4B）。四分子期の PMC には正常な四分子と，小核を含むもの（Fig. 4C）とがあった。

花粉の稔性は平均で約41～48%で，正常な場合の約½の稔性しか示さない（Fig. 4D, Table 2）。

ii. 松山型×唐津型（白浜産×屋久島産）　全ての PMC で六価染色体1つと二価染色体5つが観察された。六価染色体の一方の端部は十字形になっている（Fig. 5B）。四分子には小核の含まれているものが多く観察された（Fig. 5C）。

花粉の稔性は平均で約40%で，前述の交配の場合同様，正常な場合の約½の稔性しか示さない（Fig. 5D, Table 2）。

iii. 小樽型×唐津型（三石山産×屋久島産，親不知産×三段峡産）

対合形態は PMC によって異なっている。すなわち 1Ⅵ+5Ⅱ（Fig. 6B），1Ⅵ+4Ⅱ+1Ⅰ（Fig. 6C），1Ⅳ+6Ⅱ（Fig. 6D）などいろいろの対合の状態が観察された。最も

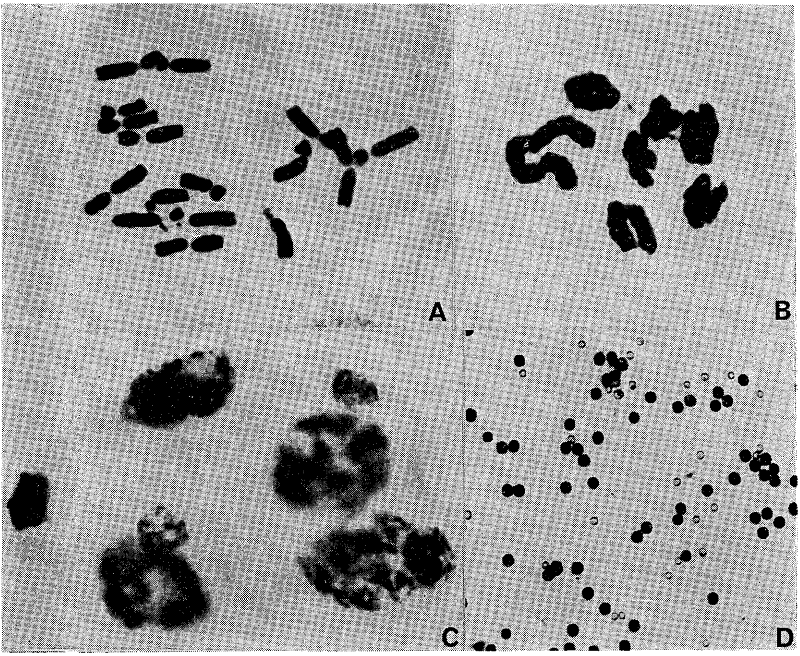

Fig. 4. Photomicrographs of mitosis, meiosis and pollen grains of F_1 hybrids between Shirahama (Matsuyama type) and Usa (Otaru type). A. Mitotic metaphase. Note the satellite chromosomes. B. Meiotic metaphase I, showing 1 tetravalent and 6 bivalents. C. Tetrad with micronuclei. D. Pollen grains not stained are judged to be sterile. A, B, C ×1500. D ×50.

頻度の高いのは 1VI+5II であった。四分子には小核の観察されるものが多かった。

花粉の稔性は平均で約15～20%で，正常な場合の約$^{1}/_{6}$～$^{1}/_{5}$で，前述の二例の交配の場合に比べても約½以下しか示さない。

討　論　キツネノボタン (2n=16) に松山型，小樽型，唐津型などの染色体多型現象が見られることはすでに報告されている (Fujishima & Kurita 1974, Okada & Tamura 1977)。それらのうち松山型，小樽型，唐津型の3型間の核型の違いは第1，第6(付随体染色体)，第8染色体を指標として明瞭に認められる (Okada & Tamura 1977 参照)。この核型の違いは現在までに調べたかぎりでは外部形態の違いと相関しない。ただ日本の北方に小樽型が，南方に唐津型が分布し，地理的に住み分けているらしいと言えるのみで，それがどの様な原因によるものなのかまだわかっていない。

筆者はこの染色体多型現象が種分化の重要な一段階である生殖的隔離に影響を与えているものと考え，この考えを交配実験によって検討した。

最初に染色体の変異以外に生殖的隔離に影響を与えているものがあるかどうか調べた。

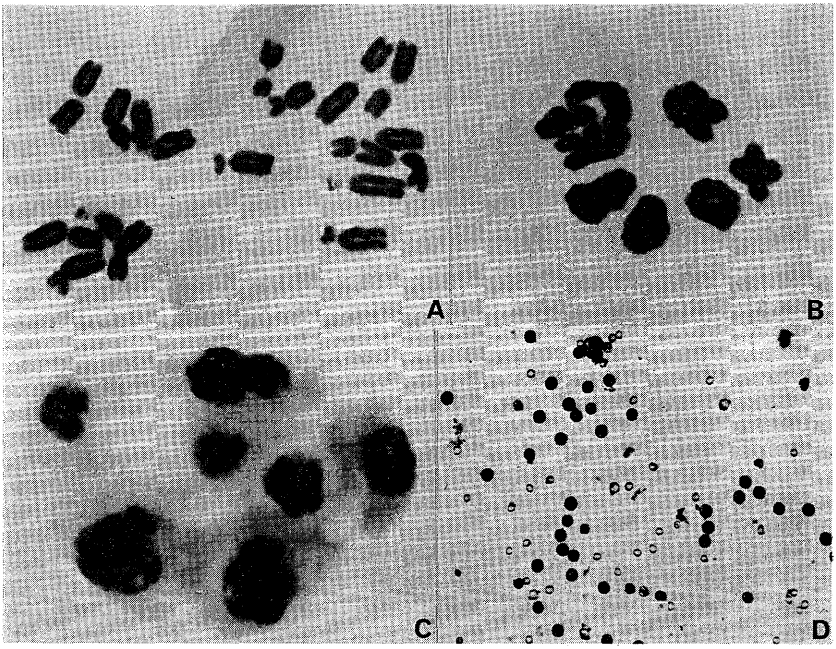

Fig. 5. Photomicrographs of mitosis, meiosis and pollen grains of F_1 hybrids between Shirahama (Matsuyama type) and Isl. Yaku (Karatsu type). A. Mitotic metaphase. Note the satellite chromosomes. B. Meiotic metaphase I, showing 1 hexavalent and 5 bivalents. C. Tetrad with micronuclei. D. Pollen grains. A, B, C ×1500. D ×50.

産地の異なった株間で交配実験を行なった結果は，同じ核型を持つ株間に生殖的隔離の現象はないことを示している。すなわち，同型異産地間の F_1 の減数分裂第 1 中期においてはいずれも正常な二価染色体が8つ観察され，四分子も正常に形成されていた（Figs. 1, 2, 3)。また花粉も正常な稔性を示していた (Table 2)。これらは自然集団中にあった親株と同じで，何ら差は認められない。

各型間の第 1，第 6，第 8 染色体の形態的変異が何に由来したのかを正確に知るにはパキテン分析などが必要であるが，今回の結果からは以下のことが推定される。異型間の F_1 の減数分裂第 1 中期の染色体の対合形態を見ると，いずれも 1 つの四価，または六価染色体が観察される。従って，松山型と小樽型の間では 2 対の染色体間で，松山型と唐津型間では 3 対の染色体間で，少なくとも転座が起っていることが推定される。小樽型と唐津型とは後述するように Fig. 7 の関係が考えられ，両型間での染色体の親和性がやや弱くなっていて様々な対合を示すものと思われる。

これら転座等の染色体の構造変化は体細胞分裂中期染色体の形から第 1，第 6，第 8 染色体において生じたものと推定される。

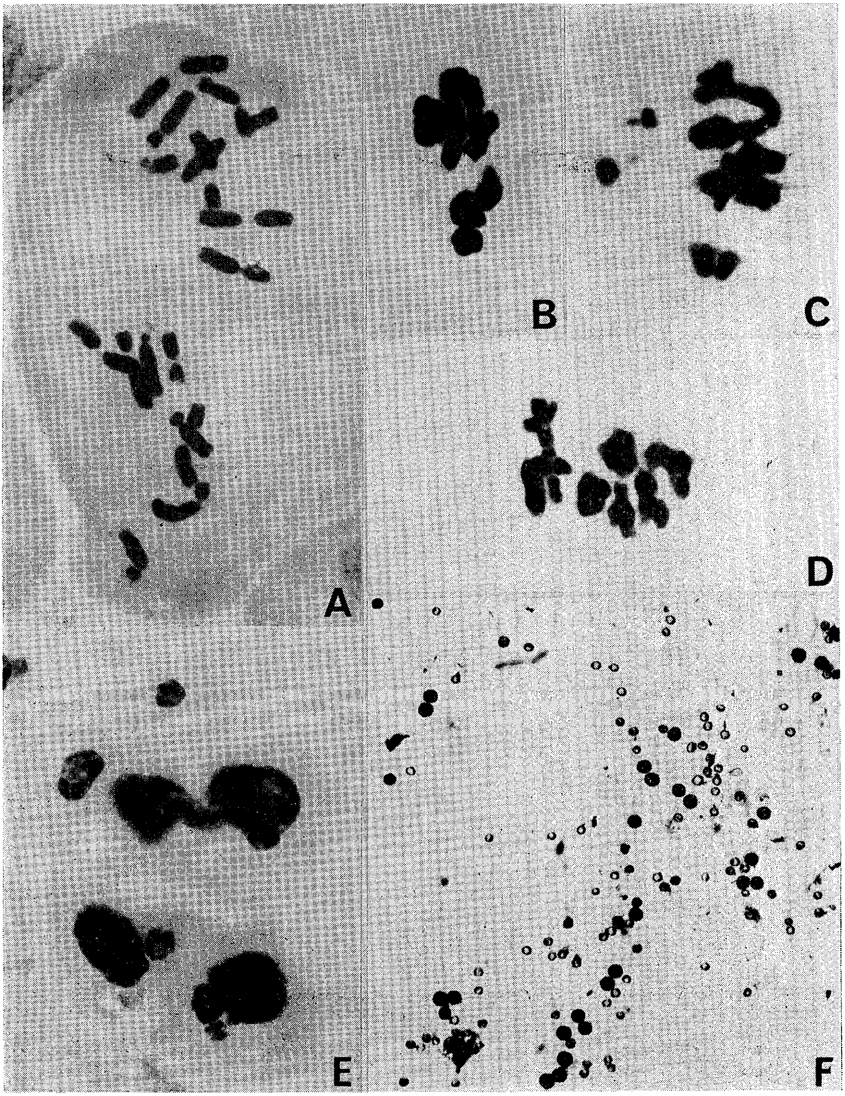

Fig. 6. Photomicrographs of mitosis, meiosis and pollen grains of F_1 hybrids between Mt. Mitsuishi (Otaru type) and Isl. Yaku (Karatsu type). A. Mitotic metaphase. Note the satellite chromosomes. B–D. Meiotic metaphase I, showing 1VI+5II (B), 1VI+4II+2I (C) and 1IV+6II (D). E. Tetrad with micronuclei. F. Pollen grains. The frequency of fertile pollen grains is lower than those of the other two combinations. A, B, C, D, E ×1500. F ×50.

Table 2. Frequencies of pollen fertility and individual numbers observed of natural populations and artificial hybrids

	Matsuyama type			Otaru type			Karatsu type		
		no.	%		no.	%		no.	%
Matsuyama type	Matsuyama	6	90±3						
	Mt. Ryozen	4	92±3						
	Shirahama	5	97±2						
	Matsuyama × Mt. Ryozen	3	94±2						
Otaru type	Shirahama × Usa	6	48±6	Atsugi	4	93±2			
	Matsuyama × Atsugi	3	41±5	Shimofuro	8	97±3			
				Usa	3	95±3			
				Mt. Mitsuishi	3	93±3			
				Oyashirazu	4	92±2			
				Atsugi × Shimofuro	3	94±3			
Karatsu type	Shirahama × Isl. Yaku	18	40±5	Mt. Mitsuishi × Isl. Yaku	3	15±1	Isl. Yaku	9	95±2
				Oyashirazu × Sandankyo	3	20±3	Sandankyo	4	90±1
							Isl. Yaku × Sandankyo	4	97±1

異型間の F_1 の花粉は明らかに稔性が低下している。同型異産地間の F_1 の稔性が正常であることから考えると，これら染色体構造変化が花粉の稔性低下に大きな影響を与えていることは明らかである。特に小樽型×唐津型の F_1 の花粉稔性は15〜20%しかなく。かなり低下している。この稔性率はツルボの AA ゲノム (2n=16)×BB ゲノム (2n=18) の F_1 の稔性率約1%に比べるとかなり高い値を示している。しかし，ケキツネノボタン（福岡県大牟田市産）×キツネボタン（白浜産）の種間雑種の稔性率が約3%であること（未発表）に比べ，同種内の F_1 としてはかなり低いもので，小樽型，唐津型の間にはかなり明瞭な生殖的隔離が認められる。

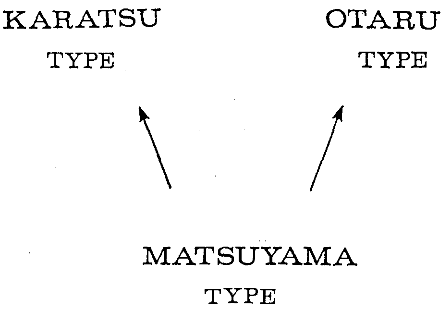

Fig. 7. Scheme showing the relationships among three karyological types. Both Otaru type and Karatsu type derived in parallel from Matsuyama type.

対合の状態，稔性率の違いからは，松山型と小樽型の間，松山型と唐津型の間の類縁性に比べ，小樽型と唐津型の間はより類縁性がうすいと考えられる。核型をも合わせて考えると，3型の間では Fig. 7 の関係があると思われる。すなわち，松山型が基本となり，これより第1，第6，第8染色体のいずれ

かで転座等によって構造的に変異し，並列的に小樽型，唐津型が分化したものであろう。

キツネノボタンの類縁群のうち，2n=16 のオトコゼリとツルキツネノボタンの核型は Kurita (1957, 1958) によって明らかにされている。それによると，いずれも松山型によく似た核型が観察されている。これは松山型がキツネノボタン類縁群の基本核型であることを示唆しており，上述の考えを支持するものであろう。

文 献 Araki, H. 1971. Cytogenetics of *Scilla scilloides* complex III. Homoeology between genomes A(x=8) and B(x=9). Jap. J. Genetics **46**: 265-275. Fujishima, H. & M. Kurita. 1974. Chromosome studies in Ranunculaceae XXVI. Variation in karyotype of *Ranunculus ternatus* var. *glaber*. Mem. Ehime Univ., Ser. B (Biol.), **7**: 62-68. Kurita, M. 1957. Chromosome studies in Ranunculaceae III. Karyotypes of the subtribe Ranunculinae. Rep. Biol. Inst. Ehime Univ. No. 2: 1-8. —— 1958. Chromosome studies in Ranunculaceae VIII. Karyotype and phylogeny. Rep. Biol. Inst. Ehime Univ. No. 5: 1-14. Okada, H. & Tamura, M. 1977. Chromosome variations in *Ranunculus quelpaertensis* and its allied species. Journ. Jap. Bot. **52**: 360-369.

Summary

Chromosome pairing in miosis and pollen fertility of hybrids among three karyotype variations in *Ranunculus silerifolius* Lév. (=*R. quelpaertensis* (Lév.) Nakai), 2n=16, are examined.

In the cases of parental individuals and hybrids between the individuals belonging to the same karyological type, normal eight bivalents are observed, and the pollen fertility is calculated as 90-97%.

On the contrary, in the cases of hybrids between the individuals showing different karyotypes, chromosome pairing and pollen fertility are as follows: Matsuyama type×Otaru type 1Ⅳ+6Ⅱ, 41-48%, Matsuyama type×Karatsu type 1Ⅵ+5Ⅱ, 40%, and Otaru type×Karatsu type 1Ⅵ+5Ⅱ, 1Ⅵ+4Ⅱ+2Ⅰ, 1Ⅳ+6Ⅱ and so on, 15-20%. In the hybrids between Otaru type and Karatsu type, various aspects of chromosome pairing are observed in each PMC, and pollen fertility is lower than that of the other two combinations. These evidences suggest the following ideas.

1. The sexual isolation is recognized among the individuals showing different karyotype, especially between those of Otaru type and Karatsu type.

2. Matsuyama type is considered to be the basic karyotype of *R. silerifolius*, and other types have been derived parallel from this type (Fig. 7). This conclusion is supported by the fact that each karyotype of 2n=16 species of the *R. cantoniensis* complex is similar to that of Matsuyama type.